

University of Groningen

## Cell envelope related processes in *Bacillus subtilis*

van den Esker, Mariëlle Henriëtte

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2018

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

van den Esker, M. H. (2018). *Cell envelope related processes in Bacillus subtilis: Cell death, transport and cold shock*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

---

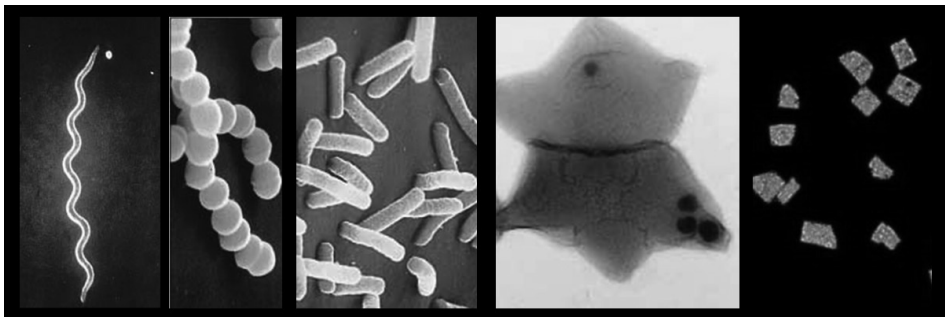
# Addendum

## Nederlandse samenvatting voor de leek

Het leven op aarde bestaat uit veel verschillende soorten, zowel zichtbare als onzichtbare. Onzichtbare organismen zijn te klein om met het blote oog zien, maar de diversiteit binnen deze groep is enorm. De microbiologie is een tak van de biologie die deze onzichtbare micro-organismen bestudeert. Onder de micro-organismen vallen ook de bacteriën. Deze zijn gemiddeld 1-5  $\mu\text{m}$  groot (dus 0,001-0,005 mm!), en daarmee veel kleiner dan eukaryote cellen waar bijvoorbeeld mensen en planten uit bestaan. Bacteriën zijn voor het eerst ontdekt door de Nederlandse bioloog en opticien Anthonie van Leeuwenhoek in 1676. Toen hij door zijn zelfgemaakte microscoop keek, zag hij bewegende cellen die hij 'beesjes, kleine diertjens of animalculen' noemde.

Bacteriën bestaan uit één cel, en zijn er in allerlei soorten en maten (Afb. 1). Ze zijn wijdverspreid op aarde, en komen voor van de ijskoude gebieden op de Polen tot in vulkanen. Hoewel bacteriën soms een slechte naam hebben omdat sommige soorten ziekteverwekkend zijn, zijn er nog veel meer soorten die ongevaarlijk of juist nodig zijn voor de mens. Zo leven er in onze darmen veel bacteriën die ons gezond houden en helpen om ons voedsel te verteren. Ook maakt de voedselindustrie gebruik van bacteriën bij de productie van gefermenteerd voedsel (bijv. wijn, zuurkool en kaas), en in de agricultuur worden steeds vaker bacteriën gebruikt als 'probiotica' waardoor het gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen verminderd kan worden. Het voordeel van bacteriën is dat ze erg snel kunnen groeien, sommigen delen elke 20 a 30 minuten als de omstandigheden optimaal zijn.

Een veel voorkomende bacterie die in de grond leeft is *Bacillus subtilis*. Dit is een staafvormige bacterie (zie Afb. 1) die vooral bij plantenwortels gevonden wordt. Als de omstandigheden verslechteren, kan hij een spore vormen: een kleine ronde, verharde cel die in een soort winterslaap gaat, en op deze manier extreme condities kan doorstaan.



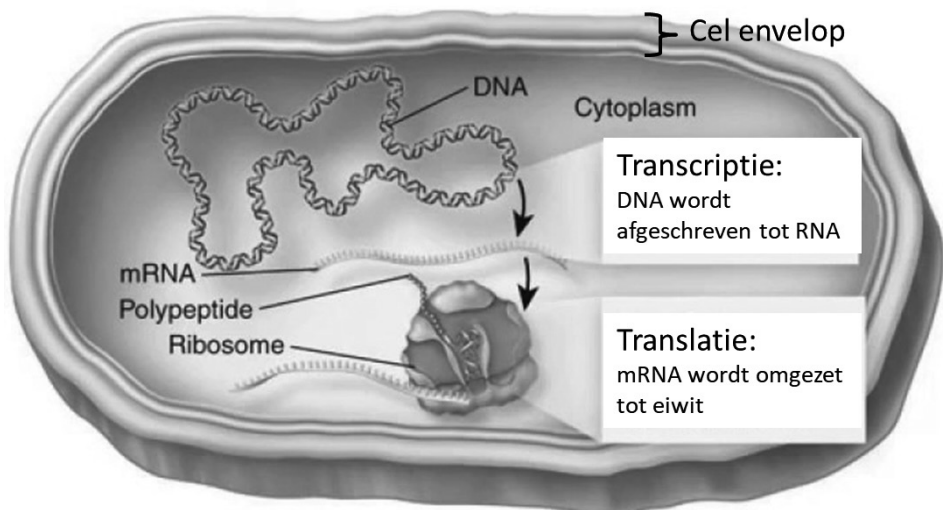
**Afbeelding 1.** Een selectie van bacteriële vormen. Van links naar rechts: Spiraalvormig, coccus, staafvormig, stervorming, rechthoekig. Bron: microbiologyinfo.com

Als spore kan *Bacillus subtilis* zeer lange periodes (duizenden jaren!) zonder voedsel, maar ook hoge en lage temperaturen overleven. Als de condities verbeteren, groeit hij weer uit tot een staafvormige cel die kan delen.

*Bacillus subtilis* is een ongevaarlijke bacterie die erg goed groeit in het laboratorium. Verder is deze bacterie makkelijk te transformeren (neemt natuurlijk DNA van buitenaf op), en omdat hij zowel 'normaal' groeit, kan sporuleren en biofilms kan maken (een kolonie van bacteriën verpakt in een dikke buitenlaag om zichzelf te beschermen) is deze bacterie al jaren veel bestudeerd door bacteriologen. Hij is daardoor uitgegroeid tot model-organisme, d.w.z. dat deze bacterie veel bestudeerd wordt en daarbij model staat voor vele andere bacteriën in dezelfde groep.

### De bacteriële cel

Bacteriën zijn kleine organismen die bestaan uit één cel. In deze cel zit alles wat zij nodig hebben om te overleven en te delen (de manier van bacteriën om zich voort te planten). Allereerst bevat een bacterie DNA. Het DNA van *Bacillus subtilis* is helemaal gesequenced, de precieze code is dus bekend. DNA ligt op het chromosoom, een soort lang 'draad' waarop de genetische code ligt. Op het chromosoom liggen genen. Dit zijn stukjes informatie die van het DNA afgelezen kunnen worden (transcriptie) en vervolgens vertaald kunnen worden naar eiwitten (translatie). Deze vertaling van DNA via RNA (de



**Afbeelding 2.** De binnenkant van een bacterie met transcriptie en translatie versimpeld weergegeven. Ook de cel envelop is weergegeven met de celmembraan (paars) en de celwand (geel). (Bron: Clark D., Pazdernik, N. (2013) Molecular Biology. 2<sup>nd</sup> ed. U.S.A.: Academic Cell).

gentranscripten) naar eiwitten wordt ook wel de centrale dogma van de biologie genoemd, en werkt in alle organismen -dus ook in mensen- hetzelfde (Afb. 2). Eiwitten bepalen hoe de cel eruit ziet en functioneert. Ze zijn de bouwstenen van de cel, en reguleren o.a. de transcriptie, communicatie en voortbeweging.

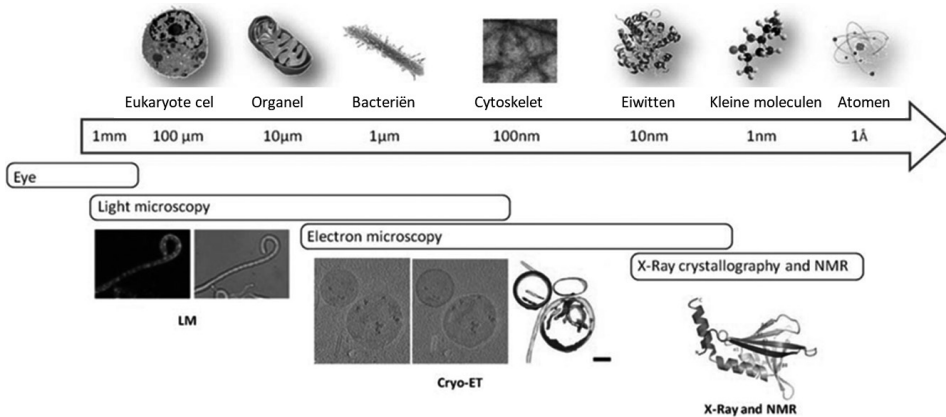
Bacteriën zijn afgescheiden van de buitenwereld door een cel envelop, dit is de barrière tussen de binnenkant van de cel en de buitenwereld (Afb. 2). De cel envelop van bacteriën is onder te verdelen in twee groepen, afhankelijk van de bouw: Gram-negatief en Gram-positief. *Bacillus subtilis* is Gram-positief. Zijn cel envelop bestaat uit de celmembraan (een vetlaag) met daaromheen een stevige celwand die ervoor zorgt dat de cel niet openknaapt en zijn vorm behoudt. Bij groei en celdeling moet de celwand hervormd worden. Bij dit proces zijn autolysines belangrijk. Deze enzymen kunnen de celwand een klein beetje openknippen, zodat er nieuwe stukjes tussen geplakt kunnen worden. De activiteit van autolysines moet sterk gereguleerd worden: als ze teveel verbindingen openknippen, verliest de celwand zijn functie verliest en kan de cel openknappen (lyseren).

De cel envelop is de eerste plaats waar contact met de buitenwereld plaats vindt, en daarnaast moet deze zich constant aanpassen bij groei en veranderende omstandigheden. Er vinden dan ook veel verschillende processen plaats, zoals voedselopname. Het bestuderen van een aantal van deze processen zijn het onderwerp van dit proefschrift.

### **Technieken om bacteriën te bestuderen**

Hoewel bacteriën niet met het blote oog te zien zijn, zijn er verschillende manieren om ze te bestuderen (Afb. 3). Allereerst is er natuurlijk de microscoop, waarmee bacteriën toch zichtbaar gemaakt kunnen worden. Er zijn verschillende soorten microscopen. De lichtmicroscoop kan ver inzoomen, waardoor bacteriën duidelijk zichtbaar worden. Ook kunnen er tegenwoordig filmpjes mee gemaakt worden, wat veel mogelijkheden met zich meebrengt. Als er bijvoorbeeld een fluorescerend eiwit aan een bepaald eiwit geplakt wordt, kan de beweging van het fluorescerende eiwit gevolgd worden, en daarmee ook het gekoppelde eiwit. Ook kan een fluorescerend eiwit aan een promotor (DNA sequentie voor een gen die bepaald hoe vaak een gen afgeschreven wordt) 'geplakt' worden, en vervolgens kan aan de felheid van de cel afgemeten worden hoe actief de promotor is, en hoe vaak dat gen ongeveer afgeschreven wordt (Zie bijv Hoofdstuk 2, Fig. 3). Een andere microscoop is de elektronenmicroscoop, die nog veel verder kan inzoomen en ook kleine moleculen zichtbaar kan maken (Hoofdstuk 5, Fig. 3).

In dit proefschrift hebben we vooral gekeken naar de functie van eiwitten. Genen coderen voor eiwitten. Het uitschakelen van een gen zorgt ervoor dat het bijbehorende eiwit niet meer geproduceerd wordt, en vervolgens kunnen we op zoek gaan naar de



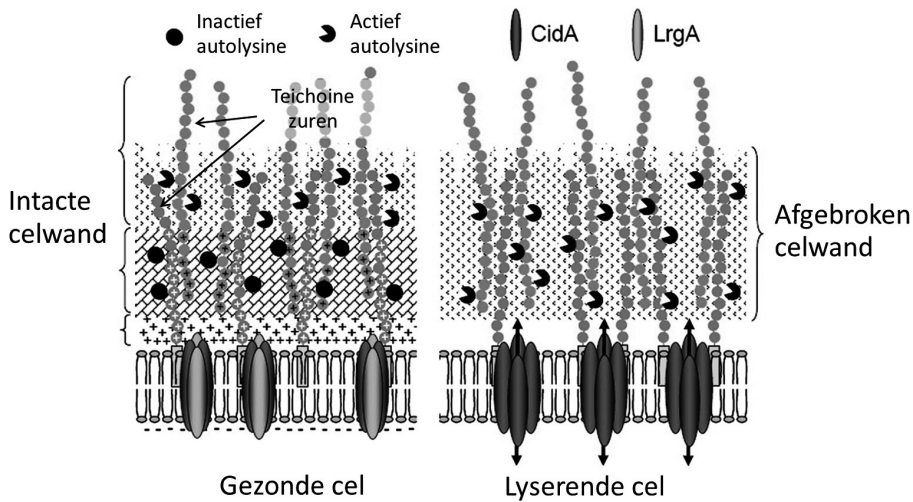
**Afbeelding 3.** De grootte van cellen en onderdelen ervan, en de resolutie van verschillende technieken waarmee deze te bestuderen zijn. Bron: Katherine Celler (2013), *Journal of Bacteriology* <sup>302</sup>.

veranderingen die dit teweeg brengt. Groeide een cel eerst heel goed op een bepaalde voedingsbron, maar na het uitschakelen van zo'n gen niet meer, dan is het gecodeerde eiwit waarschijnlijk betrokken bij het metabolisme van deze voedingsbron, hoewel er verder onderzoek nodig is om dit met zekerheid te kunnen zeggen. Op deze manier kunnen we te weten komen wat de functie van eiwitten zijn. M.b.v. computeranalyses kan vooraf ingeschat worden welke functie een eiwit heeft.

Een manier om inzicht te krijgen in genexpressie, is door het RNA te sequencen. Deze techniek kijkt naar de hoeveelheid gen-afschriften (RNA, Afb. 2) die later vertaald worden naar eiwitten. Als de cel bevroren wordt en vervolgens opengemaakt, kan het aanwezige RNA eruit gehaald worden en gesequenced worden, wat resulteert in een overzicht van alle RNA moleculen die aanwezig waren in de cel op het moment van bevriezen. Zo kan precies bekeken worden welke en hoeveel genafschriften aanwezig waren op een bepaald tijdstip. Het RNA van verschillende momenten kan vergeleken worden, en als we dit nu in verschillende omstandigheden doen, of verschillende bacteriële stammen vergelijken, kan veel inzicht verkregen worden in het bacteriële gedrag.

### **De functie van eiwitten in de cel membraan: van celdood naar transporter**

Hoewel het een tijdlang omstreden is geweest, is inmiddels bewezen dat bacteriën op sommige momenten 'zelfmoord' kunnen plegen. Dit kan onder bepaalde omstandigheden gunstig zijn. Als een bacterie bijvoorbeeld sporuleert, knapt de moedercel waarin de spore gevormd is open. Dit proces is genetisch gereguleerd, en wordt dus actief 'aangezet' door de bacterie, daarom wordt het ook wel geprogrammeerde celdood genoemd. In de



**Afbeelding 4.** Model van de werking van het Cid/Lrg netwerk. Links een gezonde cel waarin de activiteit van autolysines binnen de perken wordt gehouden door LrgA en CidA. Als *cidA* transcriptie geïnduceerd wordt, worden autolysines sterk geactiveerd en lyseert de cel (Rechts). Bron: Kelly C. Rice, and Kenneth W. Bayles (2008) Microbiol. Mol. Biol. Rev. <sup>61</sup>

bacterie *Staphylococcus aureus* is een geprogrammeerd celdoodmechanisme ontdekt waarbij cellen lyseren om hun DNA af te staan aan de biofilm die gevormd wordt. Dit DNA is deel van de matrix waar de cellen door omgeven worden in biofilms. Door zelfdoding van een klein deel van de populatie wordt zo de overgrote meerderheid geholpen. De genen die coderen voor dit celdoodproces zijn *lrgA* en *cidA*. De eiwitten LrgA en CidA bevinden zich in de celmembranen: als er veel CidA eiwitten aanwezig zijn, vormen deze eiwitten een kanaaltje die open staat waardoor de celwand wordt afgebroken door autolysines en de cel vervolgens lyseert. LrgA lijkt qua structuur op CidA, maar werkt antagonistisch: het sluit het kanaaltje waardoor de activiteit van autolysines binnen proportie blijft en de cel blijft leven (Afb. 4). Transcriptie van *lrgA* en *cidA* is sterk gereguleerd, en de cel lyseert alleen door dit programma als het echt nodig is. Onder normale omstandigheden zijn CidA en LrgA beiden aanwezig en is de cel gezond. Als de omstandigheden veranderen, bijvoorbeeld als de omgeving van de cel verzuurt door uitscheiding van acetaatzuur, activeert de regulator CidR de transcriptie van *cidA* en zal de cel lyseren. *lrgA* transcriptie wordt gereguleerd door LytSR, deze regulator voelt als de membraanpotentiaal minder wordt, waarna *lrgA* geactiveerd wordt.

Op het DNA van *Bacillus subtilis* zijn genen gevonden waarvan de sequentie sterk lijkt op *lrgA* en *cidA*: *ysbA* en *ywbH*. Daarom werd algemeen aangenomen dat deze genen coderen voor eiwitten die dezelfde functie hebben als LrgA en CidA, en daarom ook

betrokken zijn bij de regulatie van celdood. Bij aanvang van dit onderzoek wilden we meer te weten komen over de werking van geprogrammeerde celdood in *Bacillus subtilis*, en hadden daarom de hypothese dat YsbA en YwbH celdood reguleren in deze bacterie. Om dit te bewijzen hebben we allereerst de genen en hun regulatoren (*ywbl* en *lytST*) uitgeschakeld, en verschillende experimenten gedaan om te kijken of de mate van celdood daardoor veranderde in bepaalde omstandigheden (Hoofdstuk 2). Als bijvoorbeeld handmatig de *cidA* homoloog hoog tot expressie wordt gebracht, of de *lrgA* homoloog wordt uitgeschakeld, krijg je de situatie die te zien is in afbeelding 4 aan de rechterkant, waardoor verwacht wordt dat de cel lyseert. Alleen was er in geen enkel experiment een link te vinden tussen deze eiwitten en celdood. Daarom is het onwaarschijnlijk dat YsbA en YwbH betrokken zijn bij de regulatie van celdood, maar wat is dan de functie van deze eiwitten?

Eerder gepubliceerde data laat zien dat *ysbA*, de *lrgA* homoloog, onder andere hoog tot expressie komt als de bacterie de voedingsstof pyruvaat toegediend krijgt. Onze data laat zien dat de expressie van *ysbA* inderdaad geïnduceerd wordt als pyruvaat de enige voedingsbron is (Hoofdstuk 2, Fig. 4A). Als er naast pyruvaat ook glucose in het medium aanwezig is, wordt *ysbA* expressie juist onderdrukt door een mechanisme dat ervoor zorgt dat eerst de efficiëntste koolstofbronnen (glucose of malaat) geconsumeerd worden. De stam waarin *ysbA* is uitgeschakeld groeit zelfs bijna niet als pyruvaat de als voeding wordt gebruikt (Hoofdstuk 2, Fig. 4B). Dezelfde resultaten gelden voor de stam waarin de regulator *lytS* is uitgeschakeld. Als deze stammen van glucose naar pyruvaat gebracht worden, veranderen ze van vorm: eerst zijn ze staafvormig, maar in pyruvaat worden ze kleiner en ronder (Hoofdstuk 2, Fig. 5), wat een teken is dat de bacteriën niet genoeg voedingsstoffen binnen krijgen. Een laatste experiment laat zien dat YsbA en LytS bijna geen pyruvaat verbruiken (Hoofdstuk 2, Fig. 6), terwijl het wild-type, waarin deze eiwitten wel aanwezig zijn, goed groeien en ook pyruvaat opnemen. Deze experimenten laten zien dat YsbA en de bijbehorende regulator LytS nodig zijn om op pyruvaat te groeien. Een studie die even na ons onderzoek gepubliceerd werd, liet zien dat YsbA een transporteiwit is die pyruvaat opneemt in de cel, dus als deze niet meer aanwezig is kan de cel de voedingsstoffen niet opnemen wat precies in lijn is met onze bevindingen. Daarom is de nieuwe naam van YsbA nu PftA: pyruvate facilitated transporter A.

De functie van YwbH is nog steeds niet opgehelderd, maar ons onderzoek laat zien dat dit eiwit sterk tot expressie komt op de suikers malaat en glucose. Alleen groeit de mutant nog evengoed als het wild-type, dus tot zover is het niet duidelijk wat de reden hiervan is. Wellicht dat dit eiwit ook een metabolische functie heeft, maar dit zal verder onderzoek uit moeten wijzen.



## Essentiële eiwitten

Het genoom van *Bacillus subtilis* bestaat uit zo'n 4,100 genen. Veel van deze genen zijn niet essentieel, andere alleen onder bepaalde omstandigheden. Onder ideale omstandigheden (in LB, het meest ideale voedingsmedium, bij 37°C) zijn 260 genen nodig om de bacterie in leven te houden. Dit is te testen door systematisch genen uit te schakelen, en te kijken of de bacterie dit overleefd. Lange tijd werd gedacht dat teichoinezuren ook essentieel zijn, maar onlangs is het een onderzoeksgroep gelukt de productie van teichoinezuren stil te leggen. Teichoinezuren zijn negatief geladen, lange moleculen die zich uitstrekken in de gehele celwand (Zie afb. 4). Ze hebben veel functies, waaronder de regulatie van de activiteit van autolysines. Dit gebeurt op meerdere niveaus: de lading is belangrijk voor de positionering van de autolysines in de celwand, maar de hoeveelheid teichoinezuren beïnvloedt ook de transcriptie van de genen die coderen voor autolysines. Hoe dat laatste precies zit, is nog niet bekend, daar wilden wij in **hoofdstuk 3** naar kijken.

Dit hebben we gedaan door het RNA te sequencen (zie hierboven beschreven bij 'technieken'). Allereerst hebben we een stam gemaakt waarin de productie van teichoinezuren gestopt kan worden en juist versterkt kan worden, door het gen dat codeert voor de eerste stap van dit proces extra hard aan of juist uit te zetten. Onze stam liet precies het fenotype (alle waarneembare kenmerken van het organisme) zien als de mutant van de eerdere studie: cellen zagen er vreemd uit en groeiden veel langzamer (zie Hoofdstuk 3, afbeelding 1 en 2 om de vorm en groei te vergelijken met het wild-type). Nadat het RNA gesequencet was, viel ons echter op dat er een gedeelte van 270 achtereenvolgende genen helemaal niet afgeschreven was. Na een extra check bleek dat dit gedeelte van dit DNA miste, dus dat de mutant dit eruit 'geknipt' heeft. Deze rare dingen gebeuren soms in bacteriën die erg ziek zijn: door een eerste mutatie (het uitschakelen van de teichoinezuren) worden ze erg ziek waarna ze zichzelf proberen te redden door hun DNA zo aan te passen dat ze toch kunnen overleven (secundaire mutatie). Als dit zo zou zijn, is het dus helemaal niet zo dat de bacterie zonder teichoinezuren kan leven zonder dat dit grote gevolgen heeft voor de bacterie. Ons onderzoek trekt het vorige onderzoek dus in twijfel die stelt dat teichoinezuren niet-essentieel zijn: als dit altijd leidt tot secundaire mutaties elders in het DNA, zijn ze wel essentieel! Om hier helemaal van zeker van te zijn, is aanvullend onderzoek nodig, door bijvoorbeeld het DNA van alle teichoinezuur mutanten te sequencen.

## De celenvelop is belangrijk voor aanpassing aan kou

Hoewel *Bacillus subtilis* het beste groeit bij temperaturen tussen de 30 en 37°C, fluctueren de temperaturen in zijn natuurlijke habitat (de grond) natuurlijk enorm. Hij kan zich

hieraan aanpassen en daardoor temperaturen van 11 tot 55°C overleven. In de celmembraan is een soort thermometer aanwezig, die bij kou voelt dat de cel zich aan moet passen, waardoor de groei stagneert en de stofwisseling vertraagd. Verder past de vetlaag van de celmembraan zich aan, omdat deze anders te star wordt en niet meer kan bewegen. Dit gebeurt door de samenstelling van de vetzuren te veranderen, waardoor de membraan fluïde blijft. Ook activeert *Bacillus subtilis* een eiwit, YlpP, die zorgt dat de bacterie na aanpassing blijft groeien. YlpP is waarschijnlijk een regulator die de transcriptie van andere eiwitten reguleert, maar welke was tot zover nog onduidelijk.

In **Hoofdstuk 4** hebben we de kou-respons van *Bacillus subtilis* verder onderzocht. Door het RNA te sequencen van de wild-type en te vergelijken met een mutant waarin *ypLP* was uitgeschakeld, kwam naar voren dat de expressie van *ysbA* (zie hoofdstuk 2) sterk verminderde in de mutant, wat aangeeft dat YlpP dus belangrijk is om de transcriptie van *ysbA* te initiëren. Pyruvaat transport blijkt dus belangrijk te zijn voor de bacterie om zich goed aan te kunnen passen aan de kou. Hoewel de precieze reden hiervoor nog onbekend is, zijn mogelijke oorzaken bijvoorbeeld dat de pyruvaat behoefte veranderd bij lage temperaturen, of dat pyruvaat gebruikt wordt om schadelijke stoffen die ontstaan tijdens kou te op te ruimen.

### **Interactie tussen *Bacillus subtilis* en de schimmel *Aspergillus niger***

In de natuurlijke omgeving van *Bacillus subtilis* leven nog veel meer soorten micro-organismen waarmee interactie plaatsvindt, zowel direct (door bijvoorbeeld contact) en indirect (door uitscheiding van moleculen communiceren organismen met elkaar). Interactie kan neutraal zijn, of nadelen of voordelen hebben voor één of beide organismen. Zo zijn er bacteriën die voedingsstoffen met schimmels uitwisselen, of die beschutting zoeken bij de veel grotere schimmels door tegen of in hun cellen te kruipen.

Een schimmel die ook voorkomt in de grond is *Aspergillus niger*, bekend van o.a. schimmelvorming op uien. Deze schimmel wordt ook veel in het laboratorium gebruikt en is makkelijk te kweken. In **Hoofdstuk 5** onderzochten we de interactie tussen *Aspergillus niger* en *Bacillus subtilis*, en kwamen erachter dat deze tegen elkaar aan kunnen groeien: de bacterie vormt een laag op de cellen van de schimmel, en plakken er stevig aan vast (Hoofdstuk 5, Fig. 1 t/m 4). Om uit te zoeken wat voor gevolgen dit heeft voor beide organismen, hebben we een methode gevonden om tijdens deze interactie het RNA van deze organismen apart van elkaar te isoleren. Zo kregen we monsters met het RNA van *Aspergillus niger*, en met het RNA van *Bacillus subtilis*. Door het gebruik van microarrays (een techniek met ongeveer dezelfde functie als RNA sequencing) werd duidelijk dat beide organismen hun metabolisme op verschillende manieren aanpassen tijdens deze

interactie. Zo werden er in de schimmel genen geïnduceerd die betrokken zijn bij de vorming van chitine en ergosterol, twee onderdelen van de celwand van de schimmel. Dit suggereert dat de schimmel iets beter, maar in ieder geval niet slechter groeit door de hechting van de bacterie. *Bacillus subtilis* verlaagd de expressie van genen die horen bij de bacteriële stress respons, en van surfactine (een soort antibiotica) productie, wat aangeeft dat deze interactie voordelig is voor de bacterie. Of deze nieuw ontdekte interactie tussen de schimmel en bacterie ook daadwerkelijk voorkomt in de natuur moet nog verder onderzocht worden, maar omdat beide organismen gebruikt worden voor industriële toepassingen, is het de moeite waard om te bekijken of deze interactie de uitscheiding van bepaalde eiwitten veranderd, en om te zien hoe de interactie het biotechnologisch potentieel van beide organismen veranderd (bijvoorbeeld de enzym productie, groei of antibiotica productie).

### **‘Wat kunnen we hier nou allemaal mee?’: Het belang van fundamenteel onderzoek**

In dit proefschrift wordt voornamelijk fundamenteel onderzoek beschreven, wat wil zeggen dat het zich -in tegenstelling tot toegepast onderzoek- niet direct richt op toepassingen maar op het begrijpen van basismechanismen en grondbeginselen, in dit geval de processen die plaatsvinden in de cel envelop. Het doel is hierbij vooral het creëren van meer kennis en inzicht. Hoewel het belang van dit fundamentele onderzoek vaak niet direct duidelijk is, is deze tak van wetenschap van onschatbare waarde. Juist uit nieuwsgierigheid worden de belangrijkste ontdekkingen gedaan. Rond 1900 wilde Heike Kamerlingh Onnes rond 1900 zijn laboratorium in Leiden het koudste plekje op aarde maken, gewoon uit nieuwsgierigheid. Hierbij ontdekte hij supergeleiding en zag dat dit tot supersterke magneten kon leiden. Deze supermagnetten vormen nu het hart van MRI-scanners in ziekenhuizen. Andere voorbeelden van ontdekkingen die voort zijn gekomen uit fundamenteel onderzoek omvatten de ontdekking van touchscreens (al in de jaren '60!), radioactiviteit, röntgenstraling en van antibiotica. En ook al zullen bepaalde ontdekkingen geen directe toepassing krijgen binnen de maatschappij, dan nog dragen zij bij aan het vergroten van de kennis.

Toepassingen voor de resultaten uit dit onderzoek zijn zeker te bedenken: *Bacillus subtilis* wordt veel gebruikt door de industrie, en daarom is kennis van de cel envelop belangrijk om bijvoorbeeld de groei of secretie van bruikbare enzymen te kunnen optimaliseren. Ook de agricultuur maakt gebruik van *Bacillus* culturen: door deze in de grond te injecteren, kan de bodemgesteldheid verbeteren en daardoor kan bijvoorbeeld de kieming bevorderd worden. Stel dat vermenging van de *Bacillus* culturen met schimmels leidt tot andere vrijkomende verbindingen, zou dit weer nieuwe toepassingen kunnen

bieden. Verder is de cel envelop een belangrijk doelwit van verschillende antibiotica en kennis van celdood zou nieuwe aanknopingspunten kunnen bieden voor het vinden van nieuwe antibiotica-soorten, iets dat wel nodig is in deze tijd van snel toenemende antibiotica-resistentie. Kortom, genoeg mogelijkheden voor vervolgonderzoek.

## Dankwoord

Dit proefschrift is het resultaat van vele jaren werk, die, toen ik er midden in zat, soms eindeloos leken maar achteraf gezien voorbij gevlogen zijn. Ik heb veel goede herinneringen overgehouden aan de afgelopen tijd. Dat komt vooral door alle mensen die betrokken waren bij mijn onderzoek.

Allereerst wil ik Oscar bedanken. Toen ik zo'n zeven jaar geleden je kantoor binnen stapte om te praten over de mogelijkheden voor een promotietraject, had je net het nieuws gekregen dat je de Simon Stevin-prijs had gewonnen waardoor er twee promovendi hun onderzoek konden beginnen bij Moleculair Genetica. Ik ben heel blij dat ik daar één van werd, en dat ik de mogelijkheid heb gekregen om mijn onderzoek onder jou begeleiding uit te voeren. We kwamen al vrij snel met een mooi plan om geprogrammeerde celdood te onderzoeken in *Bacillus*, maar niets was wat het leek: de holines en antiholines hebben het ons flink moeilijk gemaakt! Wat een opluchting dat er na drie jaar toch resultaten kwamen die lieten blijken wat de werkelijke functie van deze eiwitten zijn. Tijdens deze moeizame weg bleef je altijd optimistisch en wist je mij steeds weer te inspireren en motiveren, ook als ik het wel eens niet meer zag zitten. Je hebt me ontzettend veel vrijheid gegeven, maar ik kon ook altijd bij je aankloppen als het nodig was. Bedankt voor de fijne werkoverleggen, maar ook je interesse op persoonlijk gebied. Ik denk dat MolGen mede hierdoor zo'n leuke groep is!

Ákos, thank you for helping me in the first year of my research and showing me the way in the lab. I am glad our collaboration continued after your move to Jena, and that you were always there with advice. I really enjoyed my visit to your gezellige (sorry, still no proper translation for that) group in Jena, and our meetings at conferences. It is great you managed to go from postdoc to professor within the timeframe of my PhD, and I wish you all the best in Denmark.

Jan Kok en Jan-Willem, bedankt voor alle ideeën en feedback op mijn projecten tijdens de MoMoMe's. Siger, Harma, Anne en Anne: zonder jullie zou MolGen niet zo soepel draaien, jullie nemen veel werk uit handen! Anne de Jong, bedankt voor al het advies op IT gebied en de hulp bij het analyseren van de RNA-seq data.

I am happy to have shared my time at MolGen with so many fun people that made working time, but also the time after work, a good time. I will never forget all the 'uitjes', international dinners, Sinterklaas celebrations, borrels, parties, cabarets and cakes (yes, there were many cakes) with prime number riddles.

Most time I have spent pipetting in the lab. I want to thank all my labmates for the great atmosphere, support and advice. It was nice to discuss about work, but also to talk about other random, interesting, weird, serious and less serious stuff.

I had the luck to share the office with some wonderful people: Bogusia, Sornchai and Maarten were there when I started. Maarten, your humor is hilarious! Jing Jing, Yi and Maike, you were my office mates during the last years of my PhD, and I really enjoyed your company. There was always a good balance between silence to concentrate at work, and distraction and fun.

Tonia, Mirjam, Ruud, Jeroen, Luiza, Barbara, Ard-Jan, Morten, Wout, Auke, Jelle, Elrike, Robyn, Manolo, Lieke, Sjoerd, Andrius, Ana, Katrin, Xin, Anne-Stephanie, Jason, DongDong, Yoshi, and all other MolGen'ers I have met: Thanks for all the feedback, cooperation, friendship and parties!

I also would like to thank my students Francesco, Luiza, Jennah and Jan. Working with you was a pleasure. Luiza, it's nice you came back to Groningen and I wish you all the best with finishing your own PhD.

Luiza and Maike, thanks for being my paranymphs, I am happy to have you by my side!

Buiten het werk om waren er altijd vrienden (en paarden..) die klaar stonden en voor de nodige afleiding zorgden. Aida, Anneke, Mariëlle en Stephanie, bedankt. Bosch, bedankt voor al je advies op Engels taalgebied. Ilse, onze schaakavonden waren altijd erg grappig :-)

Ook wil ik mijn (schoon)familie bedanken. Jullie hebben altijd interesse getoond en je best gedaan om te begrijpen wat ik deed, maar gelukkig kon ik bij jullie vaak ook even mijn onderzoek vergeten. Ik wil met name (O)Mamarijke en Hanny bedenken voor het oppassen wanneer jullie konden. Ik weet zeker dat zonder jullie hulp, dit boekje er nooit geweest zou zijn!

Johan, je stond (en staat) altijd voor me klaar, als het goed ging of allemaal even niet meer wilde... Je maakte me altijd weer aan het lachen. Bedankt dat je me de tijd hebt gegeven om alles af te ronden en soms net dat duwtje in de rug gaf om door te gaan als het nodig was.. We hebben samen een superleuke tijd gehad in Groningen, maar het is ook fijn om weer op de Veluwe te wonen met onze kleine Mara! Op naar onze volgende dromen!

